

Tavuklarda Vankomisin Dirençli Enterokokların ve Vankomisin Direnci ile İlişkili Genlerin Dağılımının Araştırılması

Haluk ÇEPOĞLU¹, Mehmet Cemal ADIGÜZEL², Arzu Funda BAĞCIGİL^{1*}, Seyyal AK¹

¹İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 34320, İstanbul, Türkiye

²Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 25240, Erzurum, Türkiye

Öz: Bu çalışmada, tavuklarda vankomisin dirençli enterokokların saptanması ve bu direnci kodlayan genlerinin belirlenmesi amacıyla 300 tavuk altlığı ve kloakal swab incelenmiştir. Örnekler Enterococcosel sıvı besiyeri ve agarı ekildi, elde edilen 107 şüpheli izolatın PZR ile cins düzeyinde identifikasyonları yapıldı. Enterococcus spp. olarak saptanan izolatlarının (n=98) fenotipik olarak vankomisin dirençleri disk difüzyon ve makro dilüsyon yöntemleri ile incelendi. Disk difüzyon yöntemi ile 49'u dirençli, 48'i orta duyarlı saptanan izolatların vankomisin MIC değerleri incelendiğinde, 5'i dirençli (MIC≥64 µg/ml), 83'ü orta duyarlı (MIC=8-16 µg/ml) ve 9'u duyarlı (MIC≤4 µg/ml) olarak bulundu. Vankomisin MIC sonucuna göre dirençli ve orta duyarlı çıkan izolatların (n=88), teikoplanin MIC değerleri belirlendi; 2'si dirençli (MIC≥32 µg/ml) ve 86'sı duyarlı (MIC≤8 µg/ml) olarak bulundu. Vankomisin'e dirençli ve orta duyarlı olduğu belirlenen izolatların, PZR ile vankomisinle ilişkili direnç genleri ve tür düzeyinde identifikasyonları yapıldı. PZR sonucunda izolatların 5'inin vanA geni taşıyan E. faecium, 29'unun vanC1 geni taşıyan E. gallinarum, 54'ünün vanC2/3 geni taşıyan E. casseliflavus oldukları belirlendi.

Anahtar sözcükler: Dışkı, Enterococcus spp., PZR, Tavuk, Vankomisin Direnci.

Investigation of Vancomycin-Resistant Enterococci and The Distribution of The Vancomycin Resistance Associated Genes in Chickens

Abstract: In this study, chicken litter and cloacal swabs (n=300) were investigated for the detection of vancomycin-resistant enterococci and determination of resistance associated genes. The samples were cultured in Enterococcosel broth and on Enterococcosel agar. One hundred seven presumptive isolates were examined by PCR at the genus level. For the determination of vancomycin resistance of Enterococcus spp. isolates (n=98), disc diffusion and macro dilution methods were performed. According to disc diffusion test, 49 isolates were resistant and 48 were intermediate and according to the macro-dilution tests, 5 of the isolates were found to be resistant (MIC≥64 µg/ml), 83 of them were intermediate (MIC=8-16 µg/ml) and 9 of them susceptible (MIC≤4 µg/ml). Vancomycin resistant and intermediate isolates were examined for detection of MIC value for teicoplanin (n=88); 2 were resistant (MIC≥32 µg/ml) and 86 susceptible (MIC≤8 µg/ml). Finally, vancomycin resistant and intermediate isolates were examined by PCR for the detection of vancomycin resistance associated genes and identification at species level. As a result of PCR, 5 of the isolates were vanA gene carrying E. faecium, 29 were E. gallinarum with vanC1 gene and 54 were E. casseliflavus with vanC2/3 gene.

Keywords: Chicken, Enterococcus spp., Faeces, PCR, Vancomycin resistance.

GİRİŞ

Enterokoklar insan ve hayvanların normal bağırsak florasının üyesi, aynı zamanda toprak, gıda ve sulardan yaygın olarak izole edilebilen Gram pozitif bakterilerdir (Bağcıgil ve ark., 2015; Akgül ve ark., 2016). Fekal kontaminasyonun indikatörü olan enterokoklar, kesim sırasında oluşabilen karkas kontaminasyonu sonucunda tüketime hazır ürünlerle insanlara bulaşabilmektedirler. Özellikle hastane infeksiyonlarına neden oldukları için önemleri giderek artmaktadır (Ertürk ve ark., 2012; Peter ve ark., 2012; Ke ve ark., 1999). Enterokoklarda doğal (intrinsik) ve kazanılmış (ekstrinsik) olmak üzere iki şekilde antimikrobiyal direnç gelişebilmektedir. Doğal direnç sefalosporin, beta laktam, sülfanomid, düşük düzeyde klindamisin ve aminoglikozidlere, kazanılmış direnç aminoglikozid, penisilin, tetrasiklin, kloramfenikol ve vankomisine karşı gelişebilmektedir (Akgül ve ark., 2016; Gülhan ve ark., 2015; Dilik ve İstanbulluoğlu, 2010; Seo ve ark., 2005). Glikopeptidlerden virjinyamisin ve avoparsin, çiftlik hayvanlarında yem katkı maddesi olarak kullanılmıştır. Ayrıca vankomisin ve teikoplanin gibi glikopeptid türevleri insanlarda enterokok infeksiyonlarının tedavisinde kullanılmaktadır (Ünal ve ark., 2010; van den Braak ve ark., 1998). Avoparsinin hayvan büyüme yemi olarak kullanılması vankomisine dirençli enterokokların (VRE) gelişmesine neden olduğu görülmüş, bu yüzden 1997 yılında Avrupa' da, 1999 yılında ise Türkiye' de yem katkısı olarak kullanılması yasaklanmıştır (Jung ve ark., 2007; Dilik ve İstanbulluoğlu, 2010).

Enterokoklarda vankomisin direnci birçok gen tarafından kodlanmaktadır: vanA, vanB, vanC1, vanC2/C3, vanD, vanE, van G, vanL,

vanN ve vanM. VanA ve VanB direnci sonradan kazanılmış direnç olarak tanımlanmaktadır. En sık saptanan vanA geni olup özellikle E. faecalis ve E. faecium' da görülür. E. gallinarum, E. casseliflavus ve E. flavescentis suşları ise intrinsik olarak düşük seviyede vankomisin direncine sahiptirler. Bunlar vanC geninde taşınırlar ve teikoplaine duyarlıdır. Enterokoklar diğer mikroorganizmalardan genetik bilginin alınmasıyla vankomisine direnç oluşturabilirler. Bu direnç çoğunlukla E. faecium ve E. faecalis suşlarında görülürse de, E. avium, E. durans ve diğer bazı enterokok türlerinde de gözlenmektedir (Akgül ve ark., 2016; Bağcıgil ve ark., 2015; Jung ve ark., 2007; Seo ve ark., 2005).

Bu çalışmada, tavuk dışkılarındaki vankomisin dirençli enterokokların varlığının incelenmesi, vankomisin direncini kodlayan genlerin araştırılması ve tavuklardaki dağılım farklılıklarının saptanması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Örnekler: İstanbul ve Balıkesir illerinin merkez ve ilçelerindeki, 12 yumurtacı tavuk ve 6 broyler kümeslerinden, Kasım 2012 – Mayıs 2013 tarihleri arasında 300 adet, tavuk altlığı ve kloakal swab toplandı. Bu örneklerin 220'si yumurtacı tavuklara ait kloakal swab, 80'i broylerlere ait dışkı altlık örnekleriydi. Dışkı bir altlık örneği, kümes içinden 6 farklı noktadan örnek alınarak oluşturuldu. Toplanan örnekler soğuk zincir altında laboratuvara ulaştırıldı. Örneklerin toplanması ile ilgili olarak İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu onayı alınmıştır (karar no:2012/81).

Vankomisin Dirençli Enterokokların İzolasyonu: Kloakal swablar 6µg/ml vankomisin içeren Enterococcosel sıvı besiyerine (BBL L007453) ekildi. Altlık örnekleri 1:9 oranında steril fizyolojik tuzlu su ile homojenize edildi ve 5'er ml'si aynı şekilde sıvı besiyerine ekildi. Kültürler 37°C'de 24 saat inkübe edildi. Renk değişimi görülen sıvı kültürlerden, 6µg/ml vankomisin içeren Enterococcosel agarlara (BBL L007376) pasajlar yapıldı, 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda eskülini hidrolize eden siyah renkteki koloniler seçilerek %7 koyun kanı ilave edilmiş Nutrient agara (BD Difco 269100) pasajlanarak saf kültürler elde edildi. Katalaz negatif, eskülini hidrolize eden, %6,5 NaCl'de üreyen Gram pozitif koklar şüpheli izolat olarak değerlendirildi (Cortes ve ark., 2006).

Enterococcus spp. spesifik primer kullanılarak PZR ile cins düzeyinde identifikasyonları yapıldı (Ke ve ark., 1999). DNA ekstraksiyonu Kariyama ve ark., (2000)'nin yöntemine göre yapıldı. Kısaca, Tripton Soy sıvı besiyerine (Oxoid CM0129) ekimleri yapılan şüpheli izolatlar 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Sıvı kültürden 50 µl alınarak, eşit hacimde %7,5 chelex 100 içeren tüplere konuldu. 100°C'de 10 dakika inkübe edildi, 13500 rpm'de 1,5 dakika santrifüj edildi ve süpernatantın 2,5 µl'si PZR karışımında hedef DNA olarak kullanıldı. 10 mM Tris HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM her bir nükleotitten (dATP, dCTP, dGTP ve dTTP), 0,5 pmol herbir primerden ve 1U Taq DNA polimeraz (FIREPol® DNA Polymerase, Solis BioDyne) katılarak 50 µl'lik PZR karışımı hazırlandı. Amplifikasyon koşulları 95°C 3 dakika ön denatürasyonu takiben, 95°C 30 saniye denatürasyon, 55°C 30 saniye bağlanma, 72°C 1 dakika uzamayı içeren 35 döngü ve 72°C'de 7 dakika son uzama olarak uygulandı (MaxyGene Gradient Therm-1000). PZR ürünleri etidyum bromür ilave edilmiş %1,5 agaroz jelde (B Low EEO Bio Basic Inc.) 0,5 x Tris-borate-EDTA buffer ile yürütüldü. 112 bp uzunluğunda PZR ürünleri pozitif olarak değerlendirildi (Ke ve ark., 1999; Tablo 1).

Glikopeptidlere Duyarlılık Deneyleri: Cins düzeyinde enterokok olarak tanımlanan suşların fenotipik olarak glikopeptidlere duyarlılıkları, CLSI standartlarına uygun olarak vankomisin (30 µg, Oxoid) diski kullanılarak disk difüzyon yöntemiyle doğrulandı. Disk difüzyon yönteminde orta duyarlı ve dirençli çıkan izolatların vankomisin ve

teikoplanin minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK) değerleri, katyonu ayarlanmış Mueller Hinton sıvı besiyerinde, makrodilüsyon yöntemiyle saptandı. Bu yöntemde; vankomisin (Sigma Aldrich) için MİK sınır değerleri ≤4 µg/ml duyarlı, 8-16 µg/ml orta derecede duyarlı, ≥32 µg/ml dirençli; teikoplanin (Sanofi Aventis) için MİK sınır değeri ≤8 µg/ml duyarlı, 16 µg/ml orta duyarlı, ≥32 µg/ml dirençli olarak kabul edildi. Kontrol suşlar olarak *S. aureus* ATCC 25923 ve *E. faecalis* ATCC 29212 kullanıldı (CLSI, 2013).

Vankomisin direnci ile ilişkili genlerin saptanması ve tür düzeyinde identifikasyonların yapılması: Vankomisin dirençli izolatların dirençle ilişkili genleri ve eş zamanlı olarak klinik önemi olan ya da sıklıkla izole edilen dört türün de identifikasyonu PZR ile yapıldı (Kariyama ve ark., 2000; Elsayed ve ark., 2001). İzolatlar 6 µg/ml vankomisin içeren Brain Heart Infusion sıvı besiyerine ekildi, 37°C'de 24 saat inkübe edildi, Kariyama ve ark. (2000)'nin yöntemine göre DNA ekstraksiyonu tamamlandı. Toplam 25 µl'lik PZR karışımı; 5 pmol *vanA* primeri, 2,5 pmol her bir *vanC1*, *vanC2/C3* ve *rrs* primerleri, 2,5 pmol *E. faecalis* spesifik primer, 1,25 pmol *vanB* ve *E. faecium* spesifik primerleri, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM her bir deoksiribonükleotid trifosfatdan (dATP, dCTP, dGTP ve dTTP) ve 0,625 U Taq DNA polimeraz (FIREPol® DNA Polymerase, Solis BioDyne) olacak şekilde hazırlandı.

Amplifikasyon koşulları 94°C 5 dakika ön denatürasyonu takiben, 94°C 1 dakika denatürasyon, 54°C 1 dakika bağlanma, 72°C 1 dakika uzamayı içeren 30 döngü ve 72°C'de 10 dakika son uzama olarak uygulandı (MaxyGene Gradient Therm-1000). Amplifikasyon sonrasında elde edilen ürünler etidyum bromür ilave edilmiş % 1,5 agaroz jelde (B Low EEO Bio Basic Inc.) 0,5 x Tris-borate-EDTA buffer ile yürütüldü. Kontrol olarak, İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı kültür koleksiyonunda bulunan *E. faecalis* ATCC 29212, *E. faecium* BM4147 (*VanA*), *E. faecalis* V583 (*VanB*), *E. gallinarum* BM4174 (*VanC1*), *E. casseliflavus* DSMZ 20680 (*VanC2/C3*), *E. faecium* CCUG542 (vankomisin duyarlı), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 kullanıldı. Çalışmada kullanılan tüm primerler Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. Çalışmada kullanılan primer dizileri.

Table 1. Primer sequences used in the study.

Gen	Primer (5' -3')	Bant uzunluğu (bp)	Referans
<i>Enterococcus</i> spp.	TACTGACAAACCATTTCATGATG AACTTCGTCACCAACGCGAAC	112	Ke ve ark., 1999
<i>vanA</i>	TACTGACAAACCATTTCATGATG AACTTCGTCACCAACGCGAAC	1030	Kariyama ve ark., 2000
<i>vanB</i>	AAGCTATGCAAGAAGCGCATG CCGACAATCAAATCATCTCTC	536	Elsayed ve ark., 2001
<i>vanC1</i> (<i>E. gallinarum</i>)	GGTATCAAGGAAACCTC CTTCCGCCATCATAGCT	822	
<i>vanC2/C3</i> (<i>E. casseliflavus</i>)	CGGGGAAGATGGCAGTAT CGCAGGGACGGTGATTTT	484	
<i>E. faecalis</i>	ATCAAGTACAGTTAGTCTTTATTAG ACGATTCAAAGCTAACTGAATCAGT	941	Kariyama ve ark., 2000
<i>E. faecium</i>	TTGAGGCAGACCAGATTGACG TATGACAGCGACTCCGATTC	658	
<i>rrs</i> (16S RNA)	GGATTAGATACCCTGGTAGTCC TCGTTGCGGGACTTAACCCAAC	320	

BULGULAR

Kültür ve bunu takiben yapılan PZR sonucunda 220 yumurtacı tavuk örneğinden 75 (%34,09)'ünde, 80 broyler örneğinden 23 (%28,75)'ünde olmak üzere toplam 98 *Enterococcus* spp. tanımlandı. Disk difüzyon yöntemi ile vankomisin dirençlilikleri araştırılan bu izolatların 49'u dirençli, 48'i orta duyarlı olarak saptandı. Fenotipik olarak duyarlı olduğu belirlenen yumurtacı hayvanlardan elde edilen bir izolat çalışmadan çıkarıldı. Disk difüzyon ile dirençli ve orta duyarlı bulunan izolatların (n=97) vankomisin MİK değerleri incelendiğinde, 88 izolatın dirençli ya da orta duyarlı olduğu saptandı. Vankomisin duyarlı bulunan 9 izolat bu aşamadan sonra çalışmadan çıkarıldı. Son olarak izolatların (n=88) teikoplanin MİK değerleri incelendiğinde de 2'sinin dirençli ve kalan 86'sının da teikoplanin duyarlı oldukları saptandı. İzolatların antibiyotik duyarlılık test sonuçları ve yetiştiricilik tiplerine göre dağılımı Tablo 2'de verilmiştir.

Vankomisin dirençli ya da orta duyarlı saptanan 88 izolatın multipleks PZR sonucunda, izolatların 5'i *vanA* geni taşıyan *E. faecium*, 29'u *vanC1* geni taşıyan *E. gallinarum*, 54'ü *vanC2/3* geni taşıyan *E. casseliflavus* oldukları belirlendi, hiçbir izolatta *vanB* geni saptanmadı. (Tablo 3).

Tablo 2. İzolatların antimikrobiyal duyarlılık sonuçları.

Table 2. Antimicrobial susceptibility results of isolates.

Yetiştiricilik tipi	Disk Difüzyon			MİK		
	Vankomisin (n=98) ^a			Teikoplanin (n=88) ^b		
	R	I	S	R	I	S
Yumurtacı	36	38	1*	5	61	8*
Broyler	13	10	0	0	22	1*
Toplam	49	48	1	5	83	9

*Duyarlı olarak belirlenen ve çalışmadan çıkartılan izolatlar, R: dirençli, I: orta duyarlı, S: duyarlı, MİK: minimum inhibisyon konsantrasyonu.

^bBir önceki testte duyarlı bulunan izolatlar bir sonraki aşamada çalışmadan çıkarıldı.

Tablo 3. Yetiştiricilik tipine göre izolatların tür dağılımı.**Table 3.** Species distribution of isolates according to rearing type.

Yetiştiricilik tipi	İzole edilen tür ve saptanan direnç ile ilişkili gen		
	<i>E. faecium</i> + <i>vanA</i>	<i>E. gallinarum</i> + <i>vanC1</i>	<i>E. casseliflavus</i> + <i>vanC2/3</i>
Yumurtacı (n=66)	5 (%7,50)	20 (%30,30)	41 (%62,20)
Broyler (n=22)	0 (%)	9 (%40,90)	13 (%59,10)
Toplam (n=(88))	5 (%7,50)	29 (%32,96)	54 (%61,36)

TARTIŞMA ve SONUÇ

Vankomisin dirençli enterokoklar (VRE) en sık karşılaşılan hastane infeksiyonlarından biri olması, etkenin hayvanlar ve hayvansal ürünlerden izole edilmesi ve bu nedenle hayvanların bir rezervuar olabileceği görüşü, bu bakteriye verilen önemin artmasına neden olmuştur. Bu nedenle ülkemizde kanatlılardan ve farklı hayvan türlerinden izole edilmiş enterokokların konu edildiği çalışmalar bulunmaktadır (Bağcıgil ve ark., 2015; Bağcıgil ve ark., 2016; Gülhan ve ark., 2015; Oktay ve ark., 2009). Tavukların dışkılarında yer alan VRE'lerin insanlara geçişinde besinlere yeterince ısı işlem uygulanması, hijyen ve sanitasyon kurallarına uyulması, etkenlerin insanlara bulaşmasını sınırlayabilmektedir. Ancak hayvan üretim yeri ve çiftlik çalışanlarında yapılan çalışmalarda bu etkenlerin hem flora bakterisi hem de infeksiyon etkeni olarak izole edildiği bildirilmiştir (van den Bogaard ve Stobberingh, 2000). Bu durum etkeni daha da önemli bir hale getirmektedir.

Kanatlı hayvan türlerinde, hem fenotipik hem de genotipik olarak VRE türlerinin araştırıldığı birçok çalışma mevcuttur. Bu çalışmaların bir kısmı tüm enterokok türlerinin izolasyonu ve bunu takiben antibiyotik dirençliliklerin saptanmasına yönelik iken, bazıları ise sadece yüksek düzey vankomisin direncini işaret eden özellikle *VanA* tipi dirence sahip enterokokların saptanmasına yönelik olarak planlanmıştır. Poeta ve ark. (2006), 152 kanatlı izolatta, Oktay ve ark. (2009), 37 *E. faecalis* ve 11 *E. faecium* izolatta fenotipik olarak vankomisin direnci saptamışlardır. Jung ve ark. (2007), 508 kanatlı dışkılarından, 7 adet *vanA* geni taşıyan *E. faecium*, 76 adet *vanC1* geni taşıyan *E. gallinarum* ve 7 adet *vanC2* geni taşıyan *E. casseliflavus* saptamışlardır. Aynı çalışmada tavuk etinden ise *vanA* geni taşıyan *E. faecium* izolasyon oranının çok daha yüksek olduğu belirtilmiştir. Bortolaia ve ark. (2015), 100 broyler kümesinde sadece vankomisin dirençli *E. faecium*'u araştırmışlar ve kümeslerin 47'sinde saptamışlardır. Sorum ve ark. (2006), 109 tavuk dışkılarından glikopeptid dirençli enterokokları (GDE) araştırmış ve %88,1'inden GDE izole etmiş ve bu izolatların %87,4' ünün *E. faecium*, geri kalanının *Enterococcus* spp. olarak tanımlandığını bildirmişlerdir. Ünal ve ark. (2010), fenotipik olarak vankomisin saptadıkları 1 *E. faecium* izolatının, *vanA* geni taşıdığı bildirmişlerdir. Akgül ve ark. (2016), tavuklara ait 192 enterokok izolatından 8'inin fenotipik olarak vankomisine dirençli ve orta duyarlı olduklarını ve bu izolatları genotipik olarak 1'ini *vanA* geni taşıyan *E. faecalis*, 2'sini *vanC1* geni taşıyan *E. casseliflavus/E. gallinarum* ve 5'ini de *vanC2/3* geni taşıyan *E. casseliflavus/E. gallinarum* olarak belirlemişlerdir. Bu çalışmada hem fenotipik hem de genotipik olarak VRE türleri araştırılmış ve 5 adet *vanA* geni taşıyan *E. faecium*, 29 adet *vanC1* geni taşıyan *E. gallinarum* ve 54 adet *vanC2/3* geni taşıyan *E. casseliflavus* izole edilmiştir. İzole edilen enterokokların tür ve sayılarının farklı olması, çalışmaların değişik coğrafik bölgelerde yapılması, farklı yetiştiricilik türlerinin olması, izolasyon yöntemlerinin ya da antibiyotik direncinin saptanmasında kullanılan yöntemlerin farklı olması, örnek çeşidinin farklılığından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

VRE'nin epidemiyolojisi açısından Avrupa ülkeleri ile Amerika Birleşik Devletleri (ABD) arasında dikkat çekici farklılıklar bulunmaktadır. Avrupa ülkelerinde VRE rezervuarı olarak çoğunlukla hayvanlar ve kanalizasyon sistemi sorumlu tutulmaktadır, ABD'de VRE kolonizasyonu, hastane dışında sık görülmekte ve nozokomial bir sorun olduğu kabul edilmektedir. Avrupa ülkeleri ve ABD arasındaki epidemiyolojik farklılığın, Avrupa ülkelerinde hayvan yemlerine kümes hayvanlarının büyüme ve gelişimini hızlandıran ve bir glikopeptid antibiyotik olan avoparsin ilave edilmesiyle ilişkili olduğu düşünülmektedir (Jung ve ark., 2007; Seo ve ark., 2005). ABD'de ise avoparsin, hayvan yemleri için lisans almış bir katkı maddesi olmadığı için kullanılmamaktadır. Seo ve ark. (2005), domuz ve kanatlı dışkı örneklerinden 6 adet *vanA* geni taşıyan 5 *E. faecium* ve 1 *E. faecalis* saptamışlardır. Bunların 3'ü avoparsin kullanılan, diğer 3'ü de avoparsin kullanılmayan kanatlı çiftliklerinden izole edildiğini bildirmişlerdir. Dilik ve İstanbulluoğlu, (2010) ise broylerlere ait kloakal sıvablardan izole ettikleri enterokok suşlarının vankomisin direncini %0,4 olarak bildirmiştir. Ünal ve ark. (2010), broylerlere ait 400 sıvab örneğinin sadece 1'inde *vanA* geni taşıyan *E. faecium* izole etmişlerdir. Bağcıgil ve ark. (2015), tavuk altlık ve rektal sıvablarından 3 adet *vanA* geni taşıyan *E. faecium* saptamışlardır. Bu çalışmada 5 adet *vanA* geni taşıyan *E. faecium* izole edilmiştir. Ülkemizde çiftliklerden antibiyotik kullanımı hakkında düzgün veri almak her zaman mümkün olmamakla birlikte, özellikle antibiyotik kullanım yasağının uygulanmasına başlamasından önceki yıllarda yapılan çalışmalarda ve bu çalışmada izole edilen VRE'lerin, avoparsinin uzun yıllar hayvan büyüme yemi olarak kullanılmış

olmasından kaynaklanabileceği göz ardı edilmemelidir. Ancak avoparsin kullanımı olmaksızın domuzlar da *vanA* geninin taşınabileceği ve avoparsin kullanımı ile ilişkili olmayabileceği de bildirilmiştir (Seo ve ark., 2005; Jung ve ark., 2007).

Vankomisin direncinin saptanmasında Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) standartlarında birkaç yöntem önerilmektedir ve farklı araştırmacı laboratuvar imkânlarına göre de farklı yöntemleri tercih etmektedirler. Bunun dışında günümüzde bazı otomatize sistemler de kullanılmaya başlanmıştır. Ancak Dombrádi ve ark. (2010), yaptıkları çalışmalarında otomatize sistemdeki bazı sorunlardan dolayı bazı suşlarda yanlış pozitif sonuçlar elde edilebileceği, dolayısıyla sonuçların MİK değerlerini geçerli test yöntemleriyle (E-Test ya da mikrodilüsyon) değerlendirilmesi gerektiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada yanlış pozitifliği ortadan kaldırmak amacıyla daha uzun ve zahmetli bir yöntem olmasına karşın makrodilüsyon yöntemi kullanılmıştır.

Vankomisin direnci araştırmalarının yapıldığı çalışmalarda inceleme örnekleri de amaca göre değişiklik göstermektedir. Hastane infeksiyonlarında, klinik olgularda infeksiyonun yerleştiği bölgelerden alınan örnekler incelenirken, saçıcılık, kolonizasyon, hayvan kaynaklı bir risk oluşumunun araştırılması gibi epidemiyolojik verilerin saptanmasına yönelik çalışmalarda ise daha çok etkenin primer olarak bulunduğu bağırsak içeriği ve dışkı örnekleri incelenmesi önerilmektedir (Bortolaia ve ark. 2015; Ertürk ve ark., 2012). Bu çalışmada enterokokların hayvanlardan insanlara geçişinde de çok önemli bir kontaminasyon kaynağı olarak bilinen dışkı örneği incelenmiştir. Dışkı materyali içerisindeki çeşitli etmenler PZR'ı olumsuz etkilediği, ayrıca dışkı, bakteriyel yönden de oldukça kontamine bir inceleme örneği olduğu için bu çalışmada öncelikle etken izolasyonu ve bunu takiben PZR ile moleküler olarak inceleme yapılmıştır.

Enterokoklarda vankomisin direnci farklı gen bölgeleri tarafından kodlanabilmektedir ve buna bağlı olarak farklı direnç tipleri görülmektedir. *VanA* tipi direnç, etken hem vankomisin hem de teikoplanine dirençli iken, *VanB* ve *VanC* tiplerinde sadece vankomisine direnç gözlenmektedir. Genel olarak vankomisin dirençli *E. gallinarum*'un *vanC* geni taşıdığı bildirilmekteyse de, *vanA* ve *vanC* genlerinin ikisini de birlikte taşıyan *E. gallinarum* suşları da rapor edilmiştir. Bu nedenle etkenin izolasyonunu takiben fenotipik olarak vankomisine dirençli olduğunu saptadıktan sonra bunu kodlayan genin saptanması epidemiyolojik açıdan önemlidir (Bonten ve ark., 2001; Coombs ve ark., 1999; Seo ve ark., 2005). Bu nedenle bu çalışmada da birçok araştırmada yapıldığı üzere izolasyonu takiben izolatlar spesifik primerler ile vankomisin direncini saptamaya yönelik PZR ile incelendi. Yapılan PZR sonucunda *vanC1* ve *vanC2/3* direnç genlerini taşıyan izolatların hiçbirinde *vanA* ya da *vanB* gen bölgeleri saptanmadı. Ancak bu çalışmada yumurtacı tavuklara ait *vanA* geni taşıyan 5 *E. faecium* izolatının, sadece 2'sinin teikoplanine dirençli olduğu gözlemlenmiş ve bu tip sonuçları elde eden çalışmalara (Bağcıgil ve ark., 2015; Gu ve ark., 2009; Park ve ark., 2008; Çetinkaya, 2000) benzer şekilde, bu izolatlar da *vanB* fenotipi taşıyan *vanA* genotipli izolatlar olarak sınıflandırılmıştır.

Avrupa'da insanlardan izole edilen *E. faecium* suşlarında *vanA* ve *vanB* tipi direnç en yaygın görülen dirençtir. Ülkemizde insanlardan izole edilen VRE kökenleri incelendiğinde *E. faecium*'un yaygın olduğu ve *vanA* geni taşıdıkları saptanmıştır (Ünal ve ark., 2010), *vanC1* ya da *vanC2* geni taşıyan izolatlardan kaynaklanan salgınlar, olgular bildirilmemiştir. Bu çalışmada düşük oranda da olsa *vanA* geni taşıyan *E. faecium* izole edilmiştir. van den Braak ve ark., (1998) *vanC1* geni taşıyan *E. gallinarum* türlerinin insanlarda infeksiyonu neden olduğunu bildirmişlerdir. Hayvanlarda yapılan çalışmalarda *vanC* geni taşıyan izolatlar bildirilmiştir (Akgül ve ark., 2016; Bağcıgil ve ark., 2015; Bağcıgil ve ark., 2016). Bu çalışmada da *vanC1* geni taşıyan *E. gallinarum* ve *vanC2/3* geni taşıyan *E. casseliflavus* türleri izole edilmiştir. Ülkemizde henüz *vanC* genotipli izolatların neden olduğu insan infeksiyonları bildirilmemiş olsa bile bu izolatların infeksiyona neden olma riski göz ardı edilemez. Bu nedenle insan ve hayvan izolatlarının karşılaştırıldığı daha fazla çalışma yapılması gerektiği düşünülmektedir.

Sonuç olarak, bu çalışmada tavuk dışkı örneklerinde değişen oranlarda vankomisin dirençli enterokoklar izole edilmiştir. *vanA* geni taşıyan *E. faecium* izolasyon oranının düşük olması umut verici bir sonuç olarak değerlendirilebilir. Ancak kanatlı hayvan ürünlerinin kesim esnasında ya da sonrasında etin işlenmesi aşamalarındaki dışkı kontaminasyonu riski düşünüldüğünde hayvanlardaki antibiyotik dirençli bakterilerin saçılımı yönündeki çalışmalarının devamlılığı halk sağlığı açısından çok önemlidir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma birinci yazarın doktora tezinden özetlenmiştir ve İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 25611 nolu proje olarak desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- Akgül Ö., Gülhan T. ve Güdücüoğlu H., (2016).** Tavuk ve martı kökenli enterokok türlerinin antibiyotik dirençliliğinin fenotipik ve genotipik analizi. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **63**, 235-244.
- Bağcıgil AF., İkiz S., Ak S. ve Özgür N., (2015).** Isolation of vancomycin resistant enterococci from animal faeces, detection of antimicrobial resistance profiles and vancomycin resistant genes. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **21**, 87-94.
- Bağcıgil AF., Koenhemi L., Çelik B., Metiner K., Or ME. ve Ak S., (2016).** Examination of vancomycin resistant enterococci (VRE) isolated from canine and feline rectal swabs. *Istanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **42**, 111-116.
- Bonten MJM., Willems R., Weinstein RA., (2001).** Vancomycin-resistant enterococci: why are they here, and where do they come from?. *The Lancet Infectious Diseases*, **1**, 314-325.
- Bortolaia V., Mander M., Jensen LB., Olsen JE. and Guardabassi L., (2015).** Persistence of vancomycin resistance in multiple clones of *Enterococcus faecium* isolated from Danish broilers 15 years after the ban of avoparcin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **59**, 2926-2929.
- Clinical and Laboratory Standards Institute, (2013).** Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Sixteenth Informational Supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, USA, M100-S23.
- Coombs GW., Kay ID., Steven RA., Pearman JW., Bertolatti D. and Grubb WB., (1999).** Should genotyping testing be done on all phenotypically vancomycin-resistant enterococci detected in hospitals?. *Journal of Clinical Microbiology*, **37**, 1229-1230.
- Cortes C., De La Fuente R., Contreras A., Sanches A., Corrales JC., Ruiz-Santa-Quiteria JA. and Orden JA., (2006).** Occurrence and preliminary study of antimicrobial resistance of enterococci isolated from dairy goats in Spain. *International Journal of Food Microbiology*, **110**, 100-103.
- Çetinkaya Y., (2000).** Vankomisin dirençli enterokoklar: epidemiyoloji ve kontrol. *Flora*, **5**, 24-33.
- Dilik Z. ve İstanbulluoğlu E., (2010).** Studies on phenotyping and genotyping characterization of *Enterococcus* spp. isolated from extensive broiler farms and rural poultry establishments. *Bornova Veteriner Kontrol Araştırma Enstitüsü Dergisi*, **32**, 37-46.
- Dombrádi Z., Bihari Z., Illésné Horváth K. and Szabó J., (2010).** Comparison of the VITEK 2 system with the E-test for the determination of glycopeptide susceptibility of *vanA* and *vanC* positive enterococci. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, **57**, 157-163.
- Elsayed S., Hamilton N., Boyd D. and Mulve M., (2001).** Improved primer design for multiplex PCR analysis of vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. *Journal of Clinical Microbiology*, **39**, 2367-2368.
- Ertürk A., Çiçek AÇ., Köksal E., Köksal ZŞ. ve Özyurt S., (2012).** Yoğun bakım ünitesinde yatan hastaların çeşitli klinik örneklerinden izole edilen mikroorganizmalar ve antibiyotik duyarlılıkları. *ANKEM Dergisi*, **26**, 1-9.
- Gu L., Cao B., Liu Y., Guo P., Song S., Li R. and Wang C., (2009).** A new Tn1546 type of VanB phenotype-*vanA* genotype vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates in mainland China. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, **63**, 70-75.
- Gülhan T., Boynukara B., Çiftçi A., Söğüt MÜ. ve Fındık A., (2015).** Characterization of *Enterococcus faecalis* isolates originating from different sources for their virulence factors and genes, antibiotic resistance patterns, genotypes and biofilm production. *Iranian Journal of Veterinary Research*, **16**, 261-266.
- Jung WK., Lim JY., Kwon NH., Kim JM., Hong SK., Koo HC. and Park YH., (2007).** Vancomycin-resistant enterococci from animal sources in Korea. *International Journal of Food Microbiology*, **113**, 102-107.
- Kariyama R., Mitsuhashi R., Chow J., Clewell D. and Kumon D., (2000).** Simple and reliable multiplex PCR assay for surveillance isolates of vancomycin-resistant enterococci. *Journal of Clinical Microbiology*, **38**, 3092-3095.
- Ke D., Picard F., Martineau F., Ménard C., Roy P., Ouellette M. and Bergeron M., (1999).** Development of a PCR assay for rapid detection of enterococci. *Journal of Clinical Microbiology*, **37**, 3497-3503.
- Oktay N., Temelli S. ve Çarlı KT., (2009).** Phenotypic characterization of *Enterococcus* spp. from femoral head necrosis lesions of chickens. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, **33**, 509-516.
- Park IJ., Lee WG., Shin JH., Lee KW. and Woo GJ., (2008).** VanB phenotype-*vanA* genotype *Enterococcus faecium* with heterogeneous expression of teicoplanin resistance. *Journal of Clinical Microbiology*, **46**, 3091-3093.
- Peter A., Radhakrishnan EK., Mathew J. and Zacharia S., (2012).** Characterization of vancomycin resistant *Enterococcus faecium* from clinical and chicken sources. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, **2**, 1738-1741.
- Poeta P., Costa D., Rodrigues J. and Torres C., (2006).** Antimicrobial resistance and the mechanisms implicated in faecal enterococci from healthy humans, poultry and pets in Portugal. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **27**, 131-137.
- Seo KS., Lim JY., Yoo HS., Bae WK. and Park YH., (2005).** Comparison of vancomycin-resistant enterococci isolates from human, poultry and pigs in Korea. *Veterinary Microbiology*, **106**, 225-233.
- Sørum M., Johnsen PJ., Aasnes B., Rosvoll T., Kruse H., Sundsfjord A. and Simonsen GS., (2006).** Prevalence, persistence, and molecular characterization of glycopeptide-resistant enterococci in Norwegian poultry and poultry farmers 3 to 8 years after the ban on avoparcin. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**, 516-521.
- Ünal N., Dilik Z. ve Yıldırım M., (2010).** Türkiye'de ticari broyler işletmelerinden *vanA* pozitif *Enterococcus faecium* izolasyonu. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **16**, 127-129.
- van den Bogaard AE. and Stobberingh EE., (2000).** Epidemiology of resistance to antibiotics: links between animals and humans. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **14**, 327-335.
- Van den Braak N., van Belkum A., van Keulen M., Vliegthart J., Verbrugh HA. and Endtz HP., (1998).** Molecular characterization of vancomycin-resistant enterococci from hospitalized patients and poultry products in The Netherlands. *Journal of Clinical Microbiology*, **36**, 1927-1932.
- Geliş tarihi:** 13.12.2016
Kabul tarihi: 22.12.2016
- *Başlıca Yazar Yazışma adresi:**
Prof. Dr. Arzu Funda BAĞCIGİL
İstanbul Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı,
34320, İstanbul, Türkiye
E-mail: fucigil@istanbul.edu.tr